黑斑双鳍电鳐(Narcine maculata)电器官ACh受体的分离、纯化及其某些特性的研究

陈丽蒟 沈国光
(中国科学院上海生理研究所)

摘 要

我们用超速离心、非离子去垢剂Tritonx—100增溶提取、亲和层析等方法从产于南中国海的黑斑双鳍电鳐(Narcine maculata)的电器官分离、纯化了ACh受体蛋白。这种电鳐的电器官每克湿组织含有与眼镜蛇神经毒素(cobrotoxin)的结合位点可达到～3 nmol。纯化后的受体蛋白，与眼镜蛇神经毒素结合的比活力约10—12 nmol/mg蛋白。受体蛋白经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳呈现两个主要条带，其表观分子量分别为38,000和53,000。ACh受体与^{125}I标记的眼镜蛇神经毒素结合的复合物在1%Triton X—100存在下用凝胶过滤法测其表观分子量约390,000。等电聚焦测得该复合物的等电点约5.6—5.7。根据超离心分析，纯化的受体蛋白的沉降系数为9 S。

存在于突触后膜上的烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)是首先被分离、纯化的一种受体蛋白。1963年，我国台湾学者发现了某些蛇神经毒素可与这种受体特异结合(Chang, et al., 1963)。这就为乙酰胆碱受体的分析、分离、纯化和鉴定提供了有力的工具。七十年代初以来，国外一些实验室运用去垢剂提取、亲和层析、超离心等方法从不同来源得到了高纯度的乙酰胆碱受体蛋白。在这个基础上，这种受体的分子结构及其生理作用分子机制方面的研究也有了一定的进展。

肌肉纤维神经肌肉接头上的ACh受体含量甚低，难以获得足够的纯品进行研究。电鳗(Electrophorus)和电鳐(Torpedo)的电器官却含有极丰富的ACh受体，因此是提取nAChR的好材料。

我们从产于我国南海的黑斑双鳍电鳐(Narcine maculata)的电器官分离、纯化了ACh

张新妹同志承担了本实验的许多技术工作，在此并致谢意。
本文1983年1月24日收到。

受体蛋白，并对它的某些分子特性作了初步测定。

一、材 料

南中国海捕获的黑斑双鳍电鳐（Narcine maculata）由渔轮冷藏运港。在现场立即剖取电器官，再冷冻保藏备用。

中华眼镜蛇（Naja naja atra）粗毒由上海市花木公司动物采购供应站提供。

本实验中使用的 $Na^{125}I$（无载体）系中国科学院原子能所产品。牛血清白蛋白（BSA）系西德 Serva公司产品。苯基甲基磺氟（PMSF）E. Merck 公司产品。去垢剂 Triton X—100系Carl Roth公司和 Rohm—Maas公司产品。氨甲酰胆碱和溴化六甲铵是Sigma公司产品。SP-Sephadex C—25、Sephadex G15、Sephadex G50、Sephadex G75、Sepharose 6B 及CNBr 活化的 Sepharose 4B 皆系瑞典 Pharmacia公司产品。Diaflo 超滤膜PM30是美国Amicon公司产品。玻璃纤维滤膜GF/A是英国Whatman公司产品。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测分子量所用的标准蛋白是西德 Boehringer Mannhein 公司产品。Sepharose 6B 凝胶过滤测分子量所用的标准蛋白是西德 Serva 公司产品。等电聚焦测等电点用的标准蛋白是Pharmacia 公司产品，两性电解质载体（Pharmalyte pH3—10）亦该公司产。

二、方 法

1.眼镜蛇（Naja naja atra）神经毒素（cobrotoxin）的分离、纯化（根据本实验室未发表的方法）：

眼镜蛇粗毒溶于0.05*M*，pH6.5 磷酸钠缓冲液，离心除去不溶物。上 SP-Sephadex C-25柱（2.7×80cm，经0.05*M*，pH6.5磷酸钠缓冲液洗涤平衡），先用上述缓冲液洗涤，然后用该缓冲液配制的 0—0.6*M* NaCl 梯度洗脱液，进行直线梯度洗脱。收集各洗脱峰，分别作毒性试验，留取毒性洗脱峰。经 Sephadex G50 凝胶过滤进一步纯化，Sephadex G15脱盐。分装，冻干保存备用。这样得到的毒素制品经Sephadex G50（细）凝胶过滤，呈现单一峰。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定，亦呈单一条带。我们做了小鸡颈二腹肌神经肌肉阻断试验，确证其为突触后神经毒素。

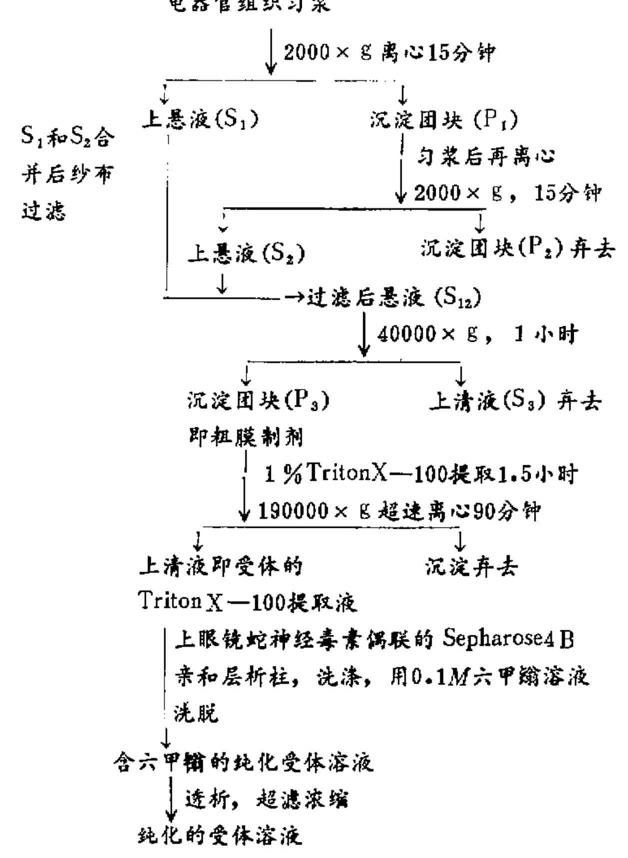
2. [^{125}I]-眼镜蛇神经毒素的制备：

我们采用Hunter和Greenwood（1962）提出的氯胺T法制备同位素碘标记眼镜蛇神经毒素。反应在磷酸钠缓冲液中进行，总体积150—200μl。含眼镜蛇神经毒素100—500μg，$Na^{125}I$ 0.5—2mCi，加入氯胺T—250μg后反应 3 分钟。立即以 1 mg偏亚硫酸钠终止反应，并加入载体kI。反应液上Sephadex G15柱分离 ^{125}I 标记神经毒素和游离 ^{125}I。^{125}I标记的眼镜蛇神经毒素的比放射活性约为 5—15miC/mg神经毒素蛋白。

3.电鳐电器官ACh受体的分离、提取：

我们主要参照了Changeux等（1980）和Froehner等（1979）的方法，适当加以修改进行电器官受体的分离，纯化。主要步骤见表 I 。

表 I：电器官ACh受体的分离纯化步骤



取100g冷冻电器官，化冻后在100ml缓冲液A中匀浆(缓冲液A即 10m*M* Tris-HCl，pH7.4缓冲液，含0.1m*M* PMSF)，慢速三次，每次30秒。匀浆以2000×g 的转速离心15分钟（东德K70 冷冻离心机，水平转子）。上悬液（S_1）保留。沉淀部份（P_1）再加100ml 缓冲液A匀浆，30 秒二次。第二次匀浆液同上条件再离心15分钟。弃去沉淀部份（P_2），第二次离心的上悬液（S_2）与 S_1 合并，经三层纱布过滤。得匀浆液约 230ml（S 12)。

将S 12悬液40000×g 离心 1 小时（MSE50超速离心机)。弃去上清液（S_3）。沉淀部份（P_3）即细胞膜碎片的粗制品。取上述粗膜制品约 5ml加适量缓冲液A匀浆使之分散。并在磁力搅拌下滴加以缓冲液A配制的10%(v/v)Triton X—100，使Triton X—100最终浓度为 1 %（v/v）。去垢剂增溶提取液的最终体积约27ml。在室温下，磁力搅拌提取1.5—2 小时。然后超速离心，转速 55000rpm（～190000×g），离心90分钟（日立85P超速离心机，RP65T转子)。吸取上清液约22.5ml。此即 ACh 受体的Triton

X—100提取液。

4.亲和层析凝胶—眼镜蛇神经毒素偶联的Sepharose4 B：

按R.Axèn等(1967) 的方法将眼镜蛇神经毒素偶联于Sepharose 4 B。每毫升凝胶与大约0.25mg眼镜蛇神经毒素偶联。偶联后的凝胶最后用缓冲液A洗涤、平衡。

5.亲和层析法纯化受体蛋白：

取ACh受体的Triton X—100提取液14ml与10ml眼镜蛇神经毒素偶联的Sepharose 4 B在室温下温和搅拌3—4小时。以后操作在4℃下进行。将反应悬浮液移入玻璃烧结层析柱，滤去母液。依下列次序洗涤亲和凝胶：

(1) 20ml缓冲液A，含1%Triton X—100。称缓冲液B。

(2) 40ml以缓冲液B配制的1*M* NaCl。

(3) 30ml以缓冲液A配制的0.1%Triton X—100。称缓冲液C。

然后加入7ml以缓冲液C配制的0.1*M*溴化六甲铵，洗下余留在凝胶中的洗涤液。再把凝胶转入约25ml 0.1*M*溴化六甲铵溶液，温和搅拌16小时。滤去凝胶颗粒，得到纯化的ACh受体蛋白溶液。0.1*M*六甲铵溶液也可代之以1*M*氨甲酰胆碱(carbachol)溶液，效果相当。受体蛋白溶液对缓冲液C透析，以除去溶液中的六甲铵。透析液至少换四次，每次500ml，磁力搅拌透析四小时。透析后溶液用Diaflo超滤膜PM30超滤浓缩。或装在透析袋内用冷风吹，浓缩至2ml，再对缓冲液C透析。以便进行蛋白浓度、活力及其它测定。

本文蛋白浓度测定都采用Lowry等的方法(1951)。用牛血清白蛋白定标准曲线。含有Triton X—100的样品，在比色前滤去沉淀，标准样品亦加等量Triton X—100。

6. ACh受体的检测方法：

(1) 硫酸铵沉淀法：参照Stephenson等(1981)的方法，并适当加以修改。含ACh受体的膜碎片或Triton X—100抽提液与[^{125}I]眼镜蛇神经毒素在室温下反应一小时后，加$\frac{1}{2}$反应体积的饱和$(NH_4)_2SO_4$溶液沉淀受体-[^{125}I]眼镜蛇神经毒素复合物。然后用GF/A玻璃纤维滤膜过滤，以30%$(NH_4)_2SO_4$溶液洗涤之。测定膜上沉淀的放射活性，计算受体活力。测定高纯度受体试样要外加“辅助蛋白”。我们用牛血清白蛋白作为辅助蛋白。空白对照组中含200倍未标记眼镜蛇神经毒素，以测定非特异性结合。

(2) Sephadex G75微型柱层析法(根据本实验室未发表的方法)；反应混和液上Sephadex G75微型柱(0.4×35cm)，用10m*M* Tris-HCl，0.1%Triton X—100(pH7.4)缓冲液进行洗脱。同样可以有效地分离复合物和未结合的标记神经毒素。测定高纯度受体制品活力也要外加“辅助蛋白”。

7. ACh受体蛋白的SDS—聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳：

聚丙烯酰胺凝胶浓度为5%。电泳在含0.1%SDS的0.1*M*磷酸钠缓冲液(pH7.2)中进行。测定分子量用的标准蛋白系大豆胰蛋白酶抑制剂(TI)，分子量21,500；牛血清白蛋白(BSA)68,000；大肠杆菌RNA聚合酶(Core enzyme)的α-亚基39,000；β-亚基155,000；β′-亚基165,000。电泳样品缓冲液是含0.2%SDS的0.01*M*(pH7.2)磷酸钠缓冲液。样品电泳前在3%巯基乙醇存在下进行90℃加热3分钟的预处理。

8. Sepharose 6B凝胶过滤法测ACh受体—[^{125}I]眼镜蛇神经毒素复合物分子量：

取10μl纯化的受体蛋白溶液，加入适量^{125}I标记的眼镜蛇神经毒素，反应在含0.1% Triton X—100 的 10m*M* Tris-HCl（pH7.4）缓冲液中进行，总体积200μl。反应进行一小时后，加入50μl（200μg）牛血清白蛋白。上Sephadex G75小层析柱，分离出受体—[^{125}I]眼镜蛇神经毒素复合物作分子量测定之用。分子量测定用的标准蛋白系铁蛋白（Ferritin）分子量364,000；牛血清白蛋白（BSA）67,000；肌红蛋白（Myoglobin）17,800。样品上Sepharose 6B柱（2×60cm），用0.05*M* Tris-HCl（pH7.5），0.1*M* NaCl，1% Triton X—100，0.01% Merthiolate 进行洗脱。检测有色蛋白洗脱峰可测其光吸收。铁蛋白，波长用340nm，肌红蛋白，410nm。无色蛋白可用Lowry法测蛋白浓度。对受体—[^{125}I]眼镜蛇神经毒素复合物则检测其放射活性。

9. ACh受体—[^{125}I]眼镜蛇神经毒素复合物的等电点（pI）测定：

取20μl ACh受体的Triton X—100提取液，加入适量^{125}I标记的眼镜蛇神经毒素，反应一小时后上Sephadex G75微型层析柱。用含0.1% Triton X—100 的 10m*M* Tris-HCl（pH7.4）缓冲液洗脱，收集前一个含有受体—[^{125}I]眼镜蛇神经毒素复合物等大分子的放射活性峰，作为电泳样品。

等电聚焦在10×20cm（厚1mm）的聚丙烯酰胺凝胶薄板上进行。凝胶浓度5%，两性电解质载体（Pharmalytc）pH范围3—10，使用时稀释16倍。电泳电源是Pharmacia ECPS 3000/150，最大电压3000V，最大功率50W。电泳时间70分钟。等电点测定用标准蛋白是胰蛋白酶原（trypsinogen）pI—9.30；小扁豆凝集素（lentil lectin）三带pI—8.65、8.45、8.15；马肌红蛋白（myoglobin）二带pI—7.35、6.85；人碳酸酐酶B（carbonic anhydrase B）pI—6.55；牛碳酸酐酶B pI—5.85；β-乳球蛋白A（β-lactoglobulin A）pI—5.20；大豆胰蛋白酶抑制剂（soybean trypsin inhibitor）pI—4.55；淀粉葡糖苷酶（amyloglucosidase）pI—3.50。

电泳完成后，将样品电泳凝胶切成2mm宽小条，分别测其放射活性，以确定放射活性带位置。

三、结 果 与 讨 论

ACh受体是一种部份包埋在细胞膜中的疏水性糖蛋白。七十年代，Changeux（1972）、Potter（1971）、Raftery（1972）、O'Brien（1972）、Karlin（1973）、Eldefrawi（1972）、Lindstrom（1974）及其他一些实验室首先用非离子去垢剂对这种受体进行增溶提取，并用亲和层析法成功地得到了高度纯化的受体蛋白。我们仍然采用这些传统的方法从黑斑双鳍电鳐的电器官分离、纯化ACh受体蛋白。有关这种电鳐的AChR的文章，国外未见报导。我国胡本荣等人1981年在《动物学研究》上报告他们从这种电鳐获得了含ACh受体的粗膜制剂和去垢剂Triton X—100提取物。我们经亲和层析纯化后的受体蛋白，其与眼镜蛇神经毒素结合的比活力达到10—12 nmol结合位点/mg蛋白。国外报导的纯化受体蛋白比活依不同来源有较大幅度的差异，一般为3—12 nmol/mg蛋白（Karlin, 1980）。我们得到的受体蛋白，其比活已接近这个范围的上限。这种电鳐电器官每克湿组织所含的毒素结合位点约可达到3 nmol。这比Potter（1971）、Raftery（1972）报导

的某些电鳐（Torpedo californica和T. marmorata）电器官的值高出一倍左右。我们从60克（湿重）电器官得到1.5mg纯化受体蛋白。提纯过程各步的比活力和得率一并列于表Ⅰ。

表Ⅰ 黑斑双鳍电鳐电器官AChR的提纯*

提纯步骤	总蛋白量mg	总活力 nmol	比活 nmol/mg蛋白	得率%
S_{12}	385	192	0.5	100
Triton 提取	53	170	3.2	88
亲和层析	1.5	18.6	12.4	10

* 从60克湿组织提纯。

纯化的ACh受体蛋白经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳呈现两个主要条带，其表观分子量分别为38,000和53,000。见图一。还有几条染色较浅的条带，分子量约为46,000、35,000。

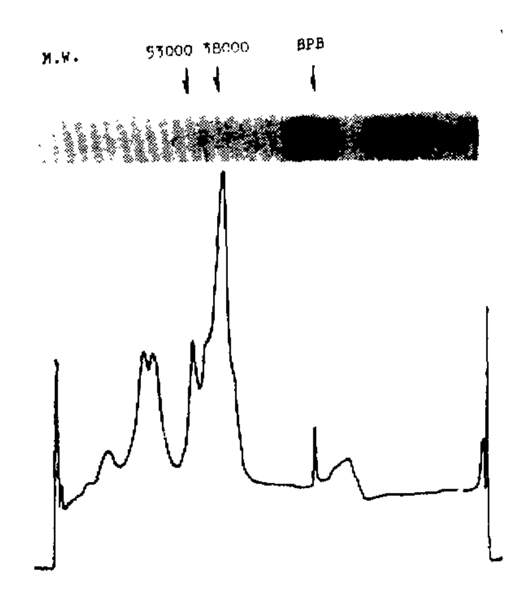


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel disc electrophoresis of receptor protein purified from Narcine electric organ. The stained gel was scanned at 565 nm. The arrows indicate the two major bands and tracking dye (bromophenol blue) front.

图一 纯化的电鳐电器官ACh受体蛋白的SDS-聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳。凝胶柱用565nm波长扫描。图上箭头指示了两个主要条带及溴酚兰（BPB）前沿的位置。

90,000附近的条带有可能是亚基未充分解离或重新组合的结果。这个图谱与Karlin (1973)、Lindstrom等(1974)报导的来源于某种电鳗的AChR的电泳图谱比较相近。国外许多实验室报导的纯化受体制品的电泳图谱各不相同。这可能与各实验室所用的方法、条件不同有关。但更可能是由于AChR的种属来源不同。不同来源的受体，它们的亚基组成可能不同。多肽亚基的数目从一至四各有报导。其中皆含有一种分子量在40,000左右的多肽亚基，它往往占有较大的克分子比例，并被验证可能是ACh结合位点所在者。我们提纯的ACh受体，条带染色最深的是分子量为38,000的亚基。可能相当于那个40,000亚基。在多个电泳条带中，当然也不能排除可能存在某些与受体结合得较紧密的其它功能的多肽链，在亲和纯化时与受体一起吸附在柱上。这些都有待进一步探讨。

ACh受体与[^{125}I]眼镜蛇神经毒素的复合物用凝胶过滤法测其表观分子量约390,000。见图二。由于洗脱液含1%Triton X—100，疏水性受体蛋白与一定量去垢剂结合，去

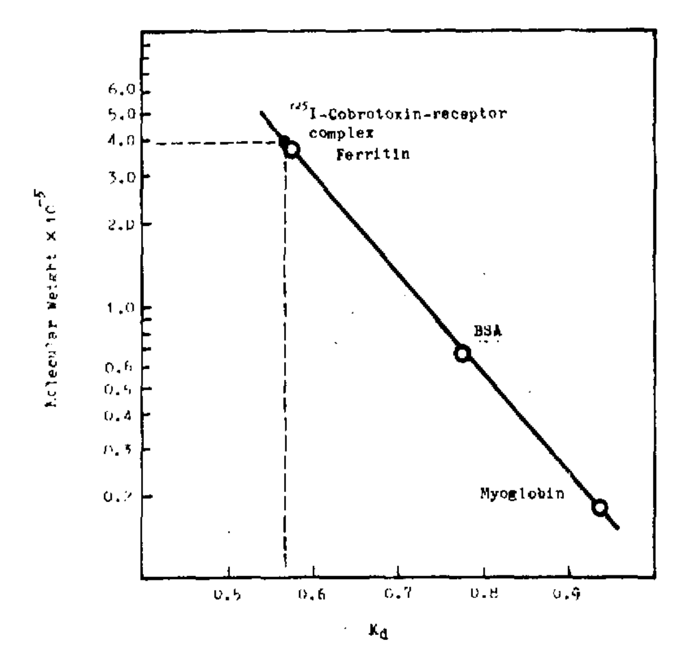


Fig. 2. Determination of the apparent molecular weight of ^{125}I-cobrotoxin-receptor complex by Sepharose 6B gel filtration.

图二 Sepharose 6B凝胶过滤法测受体—[^{125}I]眼镜蛇神经毒素复合物的分子量。图中 $Kd=\frac{V_e-V_o}{V_t-V_o}$。

垢剂在表观分子量中显然占有一定比例。这一直是这项工作中的困难问题。一些作者推测为10—20%。这样，受体——眼镜蛇神经毒素复合物的分子量可能在330,000上下。不同

来源的受体，用沉降平衡或密度梯度离心等方法测分子量，各实验室报导的数值不尽相同。有单体(monomer)分子量250,000，二聚体(dimer)分子量500,000的，也有330,000和660,000的。我们的层析谱上只有这一个毒素结合峰。受体—[^{125}I]眼镜蛇神经毒素复合物的等电点用等电聚焦聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定约5.6—5.7。见图三。这比其他作者所报告的值略高一点，但他们测的是受体与银环蛇α-神经毒素（α-Bungarotoxin）结合的复合物。

我们提纯的受体蛋白溶液，在0.1%Triton X—100存在下，作超离心分析。有两个峰，一个峰的沉降系数为9 S，另一个峰为1.4 S。根据Aharonov (1977) 的分析，1.4 S是Triton形成的微团（micelle）。9 S则相当于受体单体的沉降系数。这个值与多数作者报导的相一致。但从照片上看不出某些实验室报告的13 S峰，它相当于受体的二聚体。

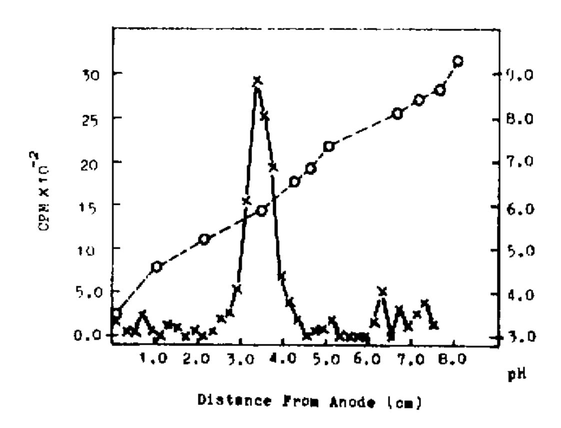


Fig. 3. Isoelectric focusing of ^{125}I-cobrotoxin-receptor complex.

图三 受体—[^{125}I]眼镜蛇神经毒素复合物的等电聚焦。

关于黑斑双鳍电鳐（Narcine maculata）电器官ACh受体的分子结构及其与各种配体（如眼镜蛇神经毒素、d-筒箭毒、十甲镙、六甲镙、氨甲酰胆碱等）结合的动力学行为，我们正在继续做进一步的实验工作。但是这样得到的受体，经非离子去垢剂Triton X—100增溶（Solubilization）、亲和层析纯化，在结构和亚基组成上很可能与它在原来磷脂双分子层中的天然状态不同。疏水性的受体蛋白天然状态下是与其周围的磷脂相互作用的。经Triton提取后，与受体疏水部份相结合的磷脂被一层去垢剂分子所取代。亲和纯化过程也包含较剧烈的分子相互作用。这些不可能不影响到受体蛋白分子的构象甚至结构组成。Changeux等（1977）把纯化的ACh受体蛋白掺入人工脂膜中，重组（reconstitution）后的膜结合受体表现了一定的离子通透性调节功能。但是Epstein（1978）等用高纯度受体膜制剂来进行重组实验更为成功。所以高比活受体膜碎片的制备及其性质研究是很有意义的。我们也有兴趣用黑斑双鳍电鳐的ACh受体富集膜碎片做

这方面的工作。并设想把两种方法得到的受体蛋白作结构、性质比较，以探讨受体蛋白结构与功能的关系。

参 考 文 献

胡本荣、沈宝莲、陈克敏、吴秀荣、张世荣 1981 动物学研究 2(4)增刊，59—65.

Aharonov, A., Tarrab-Hazdai, R., Silman, I and Fuchs, S. 1977 *Immunochem.* 14, 129—137.

Axén, R., Porath, J. and Ernback, S. 1967 *Nature* 214, 1302—1304.

Briley, M. S., and Changeux, J.—P. 1977 *Int. Rev. Neurobiol.* 20, 31—63.

Chang, C. C. and Lee, C. Y. 1963 *Arch. Int. Pharmacodyn.* 144, 241—257.

Epstein, M. and Racker, E. 1978 *J. Biol. Chem.* 253, 6660—6662.

Froehner, S. C. and Rafto, S. 1979 *Biochem.* 18, 301—307.

Hunter, W. M. and Greenwood, F. C. 1962 *Nature*, 194, 495.

Karlin, A. and Cowburn, D. A. 1973 *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 70, 3636—3640.

Karlin, A. 1980 In: Cell Surface Reviews Volume 6, The Cell Surface and Neuronal Function (C.W. Cotman, G. Poste & G. L. Nicolson, eds.) P. 205

Lindstrom, J. and Patrick, J. 1974 In: Synaptic Transmission and Neuronal Interaction (M. V. L. Bennett ed.) pp. 191—216.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951 *J. Biol. Chem.* 193, 265—275.

Miledi, R., Molinoff, P., and Potter, L. T. 1971 *Nature* 229, 554—557.

O'Brien, R. D., Eldefrawi, M. E. and Eldefrawi, A. T. 1972 *Ann. Rev. Pharmacol.* 12, 19—34.

Olsen, R. W., Meunier, J.—C. and Changeux, J.—P. 1972 *FEBS Lett.* 28, 96—100.

Raftery, M. A., Schmidt, J. and Clark, D. G. 1972 *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 882—886.

Saitoh, T. and Changeux, J.—P. 1980 *Eur. J. Biochem.* 105, 51—62.

Stephenson, F. A., Harrison, R. and Lunt, G. G. 1981 *Eur. J. Biochem.* 115, 91—97.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ACETYLCHOLINE RECEPTOR FROM NARCINE MACULATA ELECTROPLAX

Chen Lijun Shen Guoguang

(Shanghai Institute of Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

The specimens of *Narcine maculata* were obtained from South Sea of China. The electroplax was dissected out, frozen in dry ice and stored at -40°C. The frozen tissue was sliced into small pieces and homogenized. After centrifugation, the crude membrane preparation was solubilized by adding Triton X—100 to a final concentration of 1%. The Triton extract was subjected to affinity chromatography on cobrotoxin-Sepharose 4B and eluted with hexamethonium bromide (or carbamylcholine chloride). The purified acetylcholine receptor protein was concentrated by ultrafiltration on Diaflo PM 30. Cobrotoxin, isolated and purified from *Naja naja* atra, was used for the assay of acetylcholine receptor activity and also used as the ligand of affinity chromatography.

Narcine maculata electroplax contained about 3 nmol cobrotoxin binding sites per gram wet weight. The specific activity of the purified preparation ranged from 10—12 nmol of [^{125}I] cobrotoxin bound per mg of protein. Then it was analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and shown to contain two major polypeptides with apparent molecular weights of 38000 and 53000 respectively; and two minor light-stained bands with apparent molecular weights of 46000 and 35000. The Sepharose 6B gel filtration of the [^{125}I]-cobrotoxin-acetylcholine receptor complex in the presence of 1% Triton X—100 gave a single peak corresponding to molecular weight 390000. The analytical ultracentrifugation analysis of 0.1% Triton X—100 solution of the purified acetylcholine receptor showed a single peak with a sedimentation coefficient of 9S. The isoelectric point of the purified acetylcholine receptor is pH 5.6—5.7.